即时浸酸显著降低滞育家蚕卵的还原型与氧化型谷胱甘肽比值

赵林川[1,2]，时连根[2,*]
（1. 苏州大学基础医学与生物科学学院，江苏苏州 215123；2. 浙江大学动物科学学院，杭州 310029）

摘要：即时浸酸在阻止家蚕 *Bombyx mori* 卵滞育发动的同时，显著提高了家蚕卵 H_2O_2 含量。还原型谷胱甘肽（reduced glutathione，GSH）与氧化型谷胱甘肽（oxidized glutathione，GSSG）的比值是一种氧化胁迫状态的动态指标。为了调查即时浸酸是否造成滞育家蚕卵氧化胁迫，本研究利用分光光度法分别测定了滞育家蚕卵和 5 min 即时浸酸滞育家蚕卵中 GSH 和 GSSG 含量以及谷胱甘肽转移酶（glutathione-S-transferase，GST）活性。结果表明：处理后 24 h，即时浸酸处理家蚕卵的总谷胱甘肽（GSH + 2GSSG）含量、GSH 含量、GSSG 含量、GSH/GSSG 比值和 GST 活性分别相当于同期滞育家蚕卵的 204%，78%，550%，14% 和 97%。据此推测，即时浸酸在阻止滞育发动的同时，可能通过促进 GSH 氧化为 GSSG，而显著降低了 GSH/GSSG 比值，使家蚕卵处于过氧化状态。

关键词：家蚕；滞育卵；即时浸酸；谷胱甘肽；谷胱甘肽转移酶；过氧化作用
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296(2010)12-1333-06

Instant hydrochloride acid soaking reduces markedly the GSH/GSSG ratio in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*

ZHAO Lin-Chuan[1,2], SHI Lian-Gen[2,*] (1. College of Preclinical Medicine and Biological Science, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123, China; 2. College of Animal Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In the silkworm, *Bombyx mori*, H_2O_2 significantly increases in diapause eggs when diapause initiation is prevented with instant hydrochloric acid (HCl) soaking. The ratio of the reduced glutathione (GSH)/oxidized glutathione (GSSG) is indicative of the oxidative stress. To investigate whether instant HCl soaking causes the oxidative stress in diapause eggs of the silkworm, GSH and GSSG levels and glutathione-S-transferase (GST) activities in diapause eggs soaked with HCl for 5 min at 24 h after oviposition were determined using spectrophotometric methods with those without soaking with HCl as the control. Total glutathione content (GSH + 2GSSG), GSH content, GSSG content, GSH/GSSG ratio and GST activity in diapause eggs soaked with HCl were equal to 204%, 78%, 550%, 14% and 97% of those in unsoaked diapause eggs at 48 h after oviposition, respectively. It is so inferred that the marked decline of GSH/GSSG ratio in diapause eggs soaked with HCl is resulted from the stronger oxidation of GSH to GSSG, which causes the transition from the reducing conditions to the peroxidatic conditions.

Key words: *Bombyx mori*; diapause eggs; instant HCl soaking; glutathione; glutathione-S-transferase; peroxidation

谷胱甘肽（glutathione）是细胞内最重要的一种小分子抗氧化物质，其还原型（reduced glutathione，GSH）与氧化型（oxidized glutathione，GSSG）的比值 GSH/GSSG 反映了细胞的氧化胁迫状况（Lu，2009）。高 GSH/GSSG 说明细胞处于还原状态，而低 GSH/GSSG 说明细胞处于过氧化状态（Asensi *et al*.，1999）。GSH 由谷氨酰半胱氨酸连接酶（glutamate cysteine ligase，GCL）和谷胱甘肽合酶（glutathione synthase，GS）依次催化合成，其中 GCL 是限速酶。通常谷胱甘肽在细胞内不能被降解，但谷胱甘肽 S-转移酶（glutathione S-transferase，GST）可以催化 GSH 与亲核物质结合形成复合物，在起

基金项目：国家自然科学基金项目(31072090)
作者简介：赵林川，男，1968 年 2 月生，江苏东台人，副教授，主要从事自由基生物学研究，E-mail：sdzlc2008@126.com
* 通讯作者 Corresponding author，E-mail：slgsilk@zju.edu.cn
收稿日期 Received：2010-05-13；接受日期 Accepted：2010-10-28

到解毒作用的同时，也造成总谷胱甘肽(GSH + 2GSSG)含量的减少(Singh *et al.*, 2001; Vontas *et al.*, 2001; Hayes *et al.*, 2005)。一方面，GSH 在谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GPx)的催化下被 H_2O_2 氧化为 GSSG；另一方面，GSSG 在谷胱甘肽还原酶(glutathione reductase, GR)催化下被 NADPH 还原为 GSH。就昆虫细胞而言，分别由硫氧还蛋白过氧化物酶(thioredoxin peroxidase, TPx)和硫氧还蛋白还原酶(thioredoxin reductase, TrxR)代替 GPx 和 GR，负责 GSH 的氧化和 GSSG 的还原(Kanzok *et al.*, 2001)。另外，GST 也可以象 GPx 一样催化 GSH 氧化为 GSSG(Forman *et al.*, 2009)。

鉴于滞育(diapause)与蚕种生产密切相关，长期以来研究者对家蚕 *Bombyx mori* 滞育现象进行了深入研究，其研究成果不仅加深了对昆虫滞育调控机制的认识，而且有力地促进了蚕种生产技术的进步(Yamashita, 1996; 徐卫华, 1999; 黄君霆, 2003)。滞育性家蚕卵大约在产下后 24 h 左右开始滞育发动，表现为呼吸耗氧量急剧下降、糖原大量转化为山梨醇和胚胎细胞分裂放慢并且最终在 72 h 左右完全停止于细胞周期的 G_2 阶段。此后，家蚕卵就进入滞育状态，在室温下可以维持滞育状态约 300 d，直到因为水分散失导致家蚕卵溃瘪死亡。只有经历长期的低温处理，家蚕卵的滞育状态才能被解除。不过，在滞育发动阶段，进行盐酸处理，可以有效阻止滞育发动的进行，使滞育性家蚕卵象非滞育性家蚕卵一样，在大约两周时间内孵化。这种处理称为即时浸酸，已经在蚕种生产中得到广泛应用(冯家新, 2004)。与长期低温处理一样，即时浸酸可以促进家蚕滞育生物钟蛋白(time interval measuring enzyme, TIME)与抑制肽(peptidyl inhibitory needle, PIN)复合物分离，导致 TIME 的 ATPase 活性爆发(Kai *et al.*, 2008)。尽管体外试验表明，TIME 具有 ATPase、酯酶(esterase A_4, EA_4)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)等活性，但是其在家蚕卵内的天然底物和其在滞育调控中的具体功能都还不清楚。因此，即时浸酸阻止家蚕卵滞育发动的机制仍然需要进一步探讨。

近年来，我们对 H_2O_2 与家蚕滞育调控的关系进行了研究，发现即时浸酸通过抑制滞育家蚕卵过氧化氢酶(catalase, CAT)基因的转录，造成家蚕卵内 H_2O_2 水平显著升高；适当的外源 H_2O_2 处理，同样可以有效阻止家蚕卵滞育发动(Zhao *et al.*, 1999; 赵林川等, 2000; 沈爱英等, 2003; 韩武梅等, 2009)。此外，滞育发动阶段，家蚕卵 NAD^+ 含量显著下降，而 $NADP^+$ 含量显著上升，即时浸酸可以阻止上述变化(赵林川和时连根, 2008)，该结果能够较好地解释滞育发动过程中家蚕卵呼吸耗氧量急剧下降和糖原转化为山梨醇并且大量积累下来等现象。本研究以滞育家蚕卵为对照，调查了即时浸酸对滞育家蚕卵中总谷胱甘肽含量、GSH 含量、GSSG 含量及 GST 活性的影响。

1 材料与方法

1.1 家蚕品种

二化性、单系家蚕原种丰一(Feng 1)，由浙江省蚕种公司提供。

1.2 处理

温度 25 ± 1℃、连续光照下催青，孵化后常规桑叶育，幼虫期、蛹期和成虫期都置于 25 ± 1℃、光周期 12L∶12D 中，以制备滞育性家蚕卵。滞育性家蚕卵(约 30 g)产下后保护于 25 ± 1℃、光周期 12L∶12D中，在产下后 24 h 一分为二，其中一份进行即时浸酸处理以阻止滞育发动，即时浸酸处理条件为：用 1.075 g/mL HCl 液于 46 ± 1℃下浸 5 min，浸毕后用流水充分冲洗，晾干。浸酸处理家蚕卵和另一份非浸酸处理的滞育家蚕卵一起保护于 25 ± 1℃、12L∶12D中，分别每隔 24 h 取样一次，直到即时浸酸家蚕卵孵化。样品在液氮中速冻后置 -70℃保存，分别用于不同类型的谷胱甘肽含量和 GST 活性测定。每一处理均重复 3 次。

1.3 谷胱甘肽含量测定

取约 0.1 g 家蚕卵，加入 4℃下预冷的 1.0 mL 0.05 mol/L pH 7.0 PBS(含 5% 水杨酸)，在冰浴中匀浆后，4℃下 10 000 g 离心 8 min，取上清液供谷胱甘肽测定用。总谷胱甘肽、GSH 和 GSSG 含量测定按照 Krishnan 等(2007)方法进行，测定重复 3 次。

1.4 GST 活性测定

取约 0.1 g 家蚕卵，加入 4℃下预冷的 1.0 mL 0.05 mol/L pH 6.5 PBS，冰浴中匀浆后，4℃下 10 000 g离心 8 min，小心去除上层脂质后，再于 4℃下 10 000 g 离心 3 min，取上清液用于 GST 活性测定。GST 活性测定采用 1-氯-2，4-二硝基苯(CDNB)比色法(孟刚等, 2010)，测定重复 3 次。

1.5　样品可溶性蛋白质含量测定

样品提取液中可溶性蛋白质含量测定采用 Bradford(1976)报道的 G-250 比色法，测定重复 3 次。

1.6　数据统计与分析

采用 ANVOA(one way)和 Student's-Newman-Keuls post hoc test(SPSS Inc., USA)分析与比较滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵中总谷胱甘肽含量、GSH 含量、GSSG 含量和 GSH/GSSG 比值以及 GST 活性的差异显著性，$P<0.05$ 为差异显著，$P<0.01$为差异极显著。

2　结果与分析

2.1　即时浸酸对家蚕卵总谷胱甘肽含量的影响

在产下后 24－216 h 期间，滞育家蚕卵总谷胱甘肽含量处于轻微波动中，未见显著变化；即时浸酸家蚕卵总谷胱甘肽含量逐步增加，在 192 h 达到峰值，与 24 h 相比约增加414%；产下后 48－216 h 期间，即时浸酸家蚕卵总谷胱甘肽含量极显著高于滞育家蚕卵($P<0.01$)，其中即时浸酸 24 h（产下后 48 h）总谷胱甘肽含量约为同期滞育蚕卵的 204%(图 1)。

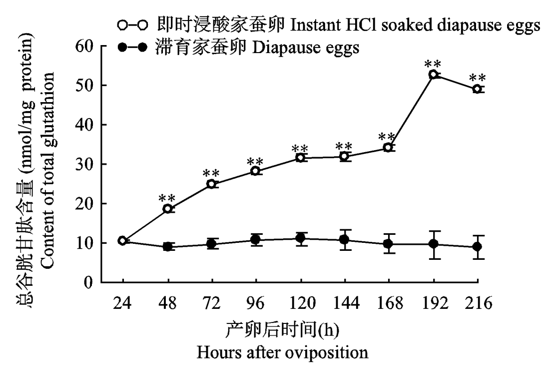


图 1　滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵总谷胱甘肽含量的变化

Fig. 1　Variation of total glutathione content in the diapause eggs and the instant HCl soaked diapause eggs of *Bombyx mori*

t 测验，* $P<0.05$，** $P<0.01$；下同。Student's *t*-test is used for statistical comparison，* $P<0.05$，** $P<0.01$. The same below.

2.2　即时浸酸对家蚕卵 GSH 含量的影响

滞育家蚕卵 GSH 含量在 96 h 达到峰值，但从 144 h 后迅速下降；即时浸酸家蚕卵 GSH 含量在 24－144 h 期间变化不显著，此后也迅速下降；即时浸酸家蚕卵 GSH 含量显著低于滞育家蚕卵($P<0.05$)，其中即时浸酸后 24 h（产下后 48 h）GSH 含量约为同期滞育蚕卵的 78%(图 2)。

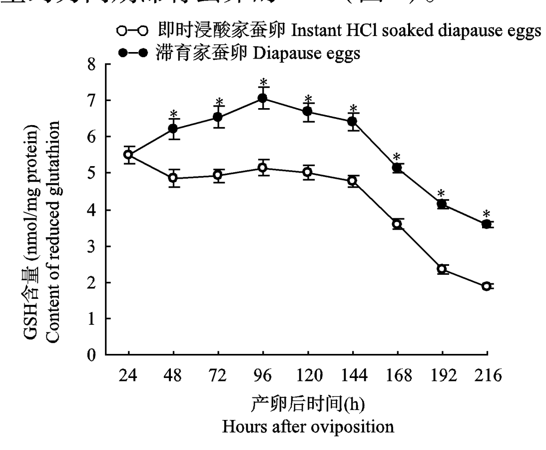


图 2　滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵 GSH 含量的变化

Fig. 2　Variation of GSH content in the diapause eggs and the instant HCl soaked diapause eggs of *Bombyx mori*

2.3　即时浸酸对家蚕卵 GSSG 含量的影响

滞育家蚕卵 GSSG 含量在产下后 24－48 h 期间显著下降，约降低41%，此后缓慢上升，但是变化不显著；即时浸酸家蚕卵 GSSG 含量显著上升，并且在 192 h 达到峰值，与 24 h 相比约升高 943%，是同期滞育家蚕卵的 9.4 倍；即时浸酸家蚕卵 GSSG 含量极显著高于滞育家蚕卵($P<0.01$)，其中即时浸酸后 24 h（产下后 48 h）GSSG 含量约为同期滞育蚕卵的 550%(图 3)。

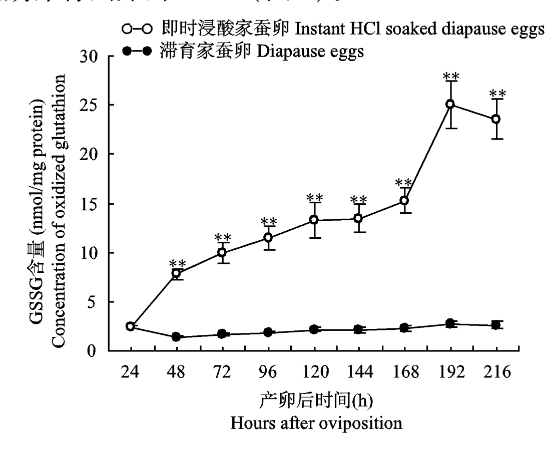


图 3　滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵 GSSG 含量的变化

Fig. 3　Variation of GSSG content in the diapause eggs and the instant HCl soaked diapause eggs of *Bombyx mori*

2.4　即时浸酸对家蚕卵 GSH/GSSG 比值的影响

在产下后 24－48 h 期间，滞育家蚕卵 GSH/GSSG 比值升高 93%，相反即时浸酸家蚕卵 GSH/

GSSG 比值下降了 73%，前者是后者的 7.0 倍；此后两者都逐步下降；滞育家蚕卵 GSH/GSSG 比值极显著高于即时浸酸家蚕卵($P<0.01$)，其中即时浸酸后 24 h（产下后 48 h）GSH/GSSG 比值约为同期滞育蚕卵的 14%(图 4)。

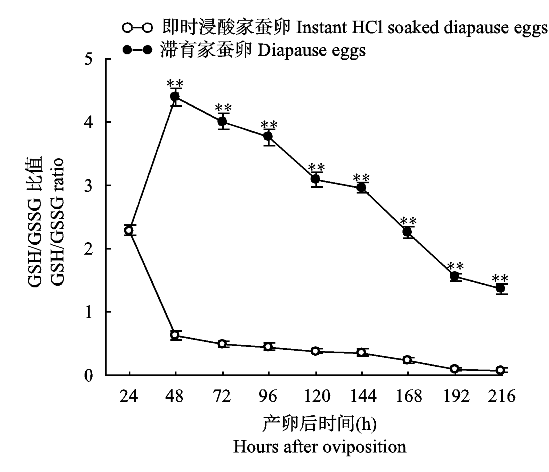


图 4 滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵 GSH/GSSG 比值的变化

Fig. 4 Variation of GSH/GSSG ratio in the diapause eggs and the instant HCl soaked diapause eggs of *Bombyx mori*

2.5 即时浸酸对家蚕卵 GST 活性的影响

滞育家蚕卵 GST 活性在产下后 24－48 h 期间极显著下降，约降低 69%，此后缓慢上升，168 h 后再次下降；即时浸酸家蚕卵 GST 活性变化在产下后 24－72 h 期间与滞育家蚕卵非常一致，但此后其活性迅速增加，在 144 h 达到峰值，与 72 h 相比约升高 425%，是同期滞育家蚕卵的 2.7 倍；即时浸酸家蚕卵 GST 活性在 96－216 h 期间显著高于滞育家蚕卵($P<0.05$)，其中即时浸酸后 24 h（产下后 48 h）GST 活性约为同期滞育蚕卵的 97%(图 5)。

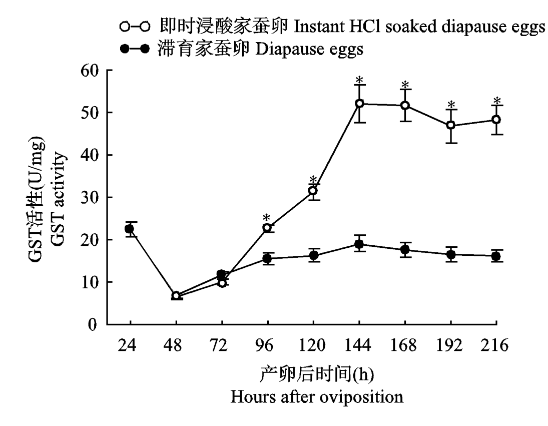


图 5 滞育家蚕卵和即时浸酸家蚕卵 GST 活性的变化

Fig. 5 Variation of GST activity between the diapause eggs and the instant HCl soaked diapause eggs of *Bombyx mori*

3 讨论

因为 TPx 和 GST 催化 GSH 氧化为 GSSG 以及 TrxR 催化 GSH 还原为 GSH 的反应并不影响细胞总谷胱甘肽(GSH＋2GSSG)含量，同时细胞内谷胱甘肽几乎不被降解，所以总谷胱甘肽含量取决于(1) GCL 和 GS 催化合成的 GSH 数量；(2) GST 催化 GSH 与亲核性物质结合形成复合物而减少的 GSH 数量(Lu, 2009；Forman *et al*., 2009)。与滞育家蚕卵相比，即时浸酸家蚕卵的总谷胱甘肽含量极显著增加，其 GST 活性在前期几乎与滞育家蚕卵完全一致，在后期极显著增加。该结果表明，即时浸酸家蚕卵中因为与亲核性物质结合形成复合物而减少的 GSH 数量与滞育家蚕卵相当(前期)或者更多(后期)。因此，即时浸酸可能促进家蚕卵 GSH 合成，造成总谷胱甘肽含量显著增加。

与总谷胱甘肽含量变化不同，GSH/GSSG 比值不仅与 GSH 合成数量和因为与亲核性物质结合形成复合物而减少的 GSH 数量有关，而且还与 GSH-GSSG 氧化还原的循环有关，即 TPx 和 GST 催化下 GSH 被 H_2O_2 氧化为 GSSG 的数量，以及 TrxR 催化下 GSSG 被 NADPH 还原为 GSH 的数量有关(Kanzok *et al*., 2001；Lu, 2009)。本研究结果显示，即时浸酸家蚕卵 GSH 含量显著低于滞育家蚕卵，相反前者 GSSG 含量极显著地高于后者。该结果表明，尽管即时浸酸可能通过促进 GCL 和 GS 催化合成 GSH，但即时浸酸家蚕卵中绝大多数 GSH 被 H_2O_2 氧化为 GSSG，即 TPx 和 GST 催化的 GSH 氧化的数量显著大于 TrxR 催化的 GSSG 还原的数量。该结果与即时浸酸显著提高了滞育家蚕卵 H_2O_2 水平，却显著减少了 NADPH 水平的研究结果一致(Zhao *et al*., 1999；赵林川等, 2000；赵林川和时连根, 2008)。值得注意的是，GST 不仅能够催化 GSH 与亲核性物质结合形成复合物，从而减少 GSH 的数量，而且可以象 TPx 一样催化 GSH 氧化为 GSSG，同样可以减少 GSH 数量(Boyland and Chasseaud, 1969；Singh *et al*., 2001；Vontas *et al*., 2001；Hayes *et al*., 2005)。即时浸酸家蚕卵前期 GST 活性几乎与滞育家蚕卵完全一致，表明至少在即时浸酸阻止滞育发动时主要由 TPx 负责催化 GSH 的氧化。后期即时浸酸家蚕卵 GST 活性极显著增加，表明 GST 可能在家蚕胚胎正常发育过程中对 GSH 氧化也具有一定作用。

本研究首次报道了即时浸酸能够显著降低滞育家蚕卵的 GSH/GSSG 比值，并且主要与 TPx 催化的 GSH 氧化加强有关。已知 GSH/GSSG 具有下列调控作用：(1)参与活性氧(reactive oxygen species, ROS)诱导细胞内 Ca^{2+} 浓度升高的过程，(2)影响细胞膜 Na^{+}-Ca^{2+} 交换体功能，(3)参与蛋白质磷酸化过程的调控，(4)调控氧化还原敏感的转录因子活性(郑荣梁和黄中洋，2007)。在滞育发动阶段，家蚕胚胎细胞分裂速度放慢，并且最终停止于细胞周期的 G_2 时期(Nakagaki *et al.*, 1991)。原先认为可能与细胞周期蛋白 Cyclin B 的表达下调有关。不过，实际测定结果表明，滞育家蚕卵与非滞育家蚕卵相比，其 *cyclin B* 基因表达不存在显著差异(Takahashi *et al.*, 1996)。在滞育发动阶段，家蚕卵蛋白质磷酸化水平发生了显著变化(Iwata *et al.*, 2005; Fujiwara and Shiomi, 2006; Lin *et al.*, 2009; Kihara *et al.*, 2009)。因此，即时浸酸极显著地降低滞育家蚕卵 GSH/GSSG 比值，可能在调控蛋白质磷酸化过程中具有重要作用。为了阐明即时浸酸阻止家蚕卵滞育发动的分子机制，今后需要进一步测定即时浸酸处理对滞育家蚕卵 GSH 代谢的影响，尤其是对 TPx 和 TrxR 活性的影响，并且探讨 GSH/GSSG 比值的显著降低在家蚕卵蛋白质磷酸化中的调控作用。

参 考 文 献 (References)

Asensi M, Sastre J, Pallardo FV, Lloret A, Lehner M, Asuncion JG, Viña J, 1999. Ratio of reduced to oxidized glutathione as indicator of oxidative stress status and DNA damage. *Methods Enzymol.*, 299: 267 - 276.

Bradford MM, 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, 72: 248 - 254.

Feng JX, 2004. The method of hatching *Bombyx* diapause eggs by hydrochloric acid treatment. In: Feng JX ed. A Collection of Research Papers on Multiplication of Silkworm *Bombyx mori*. Zhejiang University Press, Hangzhou. 706 - 727. [冯家新, 2004. 蚕种的盐酸孵化法. 见: 冯家新 主编. 蚕种繁育选集. 杭州: 浙江大学出版社. 706 - 727]

Forman HJ, Zhang H, Rinna A, 2009. Glutathione: overview of its protective roles, measurement, and biosynthesis. *Mol. Aspects Med.*, 30: 1 - 12.

Fujiwara Y, Shiomi K, 2006. Distinct effects of different temperatures on diapause termination, yolk morphology and MAPK phosphorylation in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 52: 1194 - 1201.

Han WM, Shi LG, Zhao LC, 2009. Effects of different incubation on expression of catalase gene in the bivoltine silkworm (*Bombyx mori*). *Acta Entomol. Sin.*, 52: 604 - 609. [韩武梅, 时连根, 赵林川, 2009. 不同催青方式对二化性家蚕过氧化氢酶基因表达的影响. 昆虫学报, 52: 604 - 609]

Hayes JD, Flanagan JU, Jowsey IR, 2005. Glutathione transferase. *Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol.*, 45: 51 - 88.

Huang JT, 2003. Studies on the molecular mechanism of diapause in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 29: 1 - 6. [黄君霆, 2003. 家蚕滞育分子机制的研究. 蚕业科学, 29: 1 - 6]

Iwata KI, Shindome C, Kobayashi Y, Takeda M, Yamashita O, Shiomi K, Fujiwara Y, 2005. Temperature-dependent activation of ERK/MAPK in yolk cells and its role in embryonic diapause termination in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 51: 1306 - 1312.

Kai H, Tani N, Isobe M, 2008. Interactions between TIME and PIN could play a role in the system that controls the duration of diapause development and synchronization with seasonal cycles in the silkworm, *Bombyx mori*. *Entomol. Res.*, 38: 179 - 187.

Kanzok SM, Fechner A, Bauer H, Ulschmid JK, Müller HM, Botella-Munoz J, Schneuwly S, Schirmer RH, Becker K, 2001. Substitution of the thioredoxin system for glutathione reductase in *Drosophila melanogaster*. *Science*, 291: 643 - 646.

Kihara F, Itoh K, Iwasaka M, Niimi T, Yamashita O, Yaginuma T, 2009. Glycerol kinase activity and glycerol kinase-3 gene are up-regulated by acclimation to 5℃ in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem. Mol. Biol.*, 39: 763 - 769.

Krishnan N, Večeřa J, Kodrík D, Sehnal F, 2007. 20-Hydroxyecdysone prevents oxidative stress damage in adult *Pyrrhocoris apterus*. *Arch. Insect Biochem. Physiol.*, 65: 114 - 124.

Lin JL, Lin PL, Gu SH, 2009. Phosphorylation of glycogen synthase kinase-3β in relation to diapause processing in the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Insect Physiol.*, 55: 593 - 598.

Lu SC, 2009. Regulation of glutathione synthesis. *Mol. Aspects Med.*, 30: 42 - 59.

Meng G, Sima YH, Zhao LC, 2010. Variation of glutathione S-transferase in eggs of bivoltine strain (*Bombyx mori*) during diapause process. *Acta Sericol. Sin.*, 36: 170 - 174. [孟刚, 司马杨虎, 赵林川, 2010. 二化性家蚕滞育过程中谷胱甘肽 S-转移酶活性的变化. 蚕业科学, 36: 170 - 174]

Nakagaki M, Takei R, Nagashima E, Yaginuma T, 1991. Cell cycles in embryos of the silkworm, *Bombyx mori*: G_2-arrest at diapause stage. *Roux's Arch. Dev. Biol.*, 200: 223 - 229.

Shen AY, Zhao LC, Liu HT, 2003. Study on the activation of silkworm diapausing eggs with hydrogen peroxide. *Acta Sericol. Sin.*, 29: 311 - 313. [沈爱英, 赵林川, 刘慧婷, 2003. 外源 H_2O_2 活化家蚕滞育性卵的研究. 蚕业科学, 29: 311 - 313]

Singh SP, Coronella JA, Beneš H, Cochrane BJ, Zimniak P, 2001. Catalytic function of *Drosophila melanogaster* glutathione S-transferase DmGSTS1-1 (GST-2) in conjugation of lipid peroxidation end products. *Eur. J. Biochem.*, 268: 2912 - 2923.

Takahashi M, Niimi T, Ichimura H, Sasaki T, Yamashita O, Yaginuma T, 1996. Cloning of a B-type cyclin homolog from *Bombyx mori* and the profiles of its mRNA level in non-diapause and diapause eggs.

Dev. Genes Evol., 206: 288 – 291.

Vontas JG, Small GJ, Hemingway J, 2001. Glutathione S-transferases as antioxidant defence agents confer pyrethroid resistance in *Nilaparvata lugens*. *Biochem. J.*, 357: 65 – 72.

Xu WH, 1999. Advances in insect diapause studies. *Acta Entomol. Sin.*, 42: 100 – 107. [徐卫华, 1999. 昆虫滞育的研究进展. 昆虫学报, 42: 100 – 107]

Yamashita O, 1996. Diapause hormone of the silkworm, *Bombyx mori*: structure, gene expression and function. *J. Insect Physiol.*, 42: 669 – 679.

Zhao LC, Shi LG, 2008. Changes of NAD^+ and $NADP^+$ content in diapause eggs of the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Sericol. Sin.*, 34: 447 – 452. [赵林川, 时连根, 2008. 家蚕滞育卵中辅酶Ⅰ和辅酶Ⅱ的含量变化. 蚕业科学, 34: 447 – 452]

Zhao LC, Sima YH, Li B, Shen XM, 2000. Effects of hydrochloric acid on the metabolism of hydrogen peroxide in the silkworm embryon. *Acta Sericol. Sin.*, 26: 268 – 270. [赵林川, 司马杨虎, 李兵, 沈小明, 2000. 即时浸酸对家蚕胚胎发育中 H_2O_2 代谢的影响. 蚕业科学, 26: 268 – 270]

Zhao LC, Sima YH, Shen XM, 1999. Metabolism of hydrogen peroxide in the course of embryonic development in silkworm. *Dev. Reprod. Biol.*, 8(2): 41 – 48.

(责任编辑: 赵利辉)